



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98100266.8

[43]公开日 1998 年 8 月 19 日

[11] 公开号 CN 1190674A

[22]申请日 98.1.23

[71]申请人 清华大学

地址 100084北京市海淀区清华园

[72]发明人 陈国强 李莹青 陈金春

赵 错 吴 琼

[74]专利代理机构 清华大学专利事务所

代理人 廖元秋

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 从细菌菌体中分离提纯细菌胞内聚羟基脂肪酸酯的方法

[57]摘要

本发明属于生物工程下游后处理技术领域。包括：(1) 用阴离子表面活性剂在碱性条件下处理发酵所得的细菌菌体，离心提取其内含的聚羟基脂肪酸酯颗粒；(2) 再用蛋白酶处理前一步所得的聚羟基脂肪酸酯产物，(3) 收集并干燥所得聚羟基脂肪酸酯产品。本发明利用较为廉价的原料，反应条件温和，生产设备投资少，适合工业化大规模生产的要求，使聚羟基脂肪酸酯的生产成本大大降低。

权 利 要 求 书

1. 一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于包括以下步骤：1) 先用阴离子表面活性剂碱性溶液搅拌洗涤细菌菌体；2) 分离提取固相的聚羟基脂肪酸脂颗粒；3) 再用碱性蛋白酶溶液进一步搅拌洗涤所说颗粒，除去残留的蛋白杂质；4) 分离提取纯化的固相聚羟基脂肪酸脂颗粒；5) 干燥得到粉末状聚羟基脂肪酸脂产品。

2. 如权利要求1所述的一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于所说的碱性溶液的 pH 值在 9—13 范围内。

3. 如权利要求1所述的一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于洗涤温度在 20—100℃ 范围内。

4. 如权利要求1所述的一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于所说的分离提取方法为离心或过滤分离收集洗涤液中的沉淀物。

5. 如权利要求1、2、3 或 4 所述的一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于还进一步在所说的第二、第三步骤之间包括用水洗涤所说颗粒，并分离提取固相聚羟基脂肪酸脂颗粒。

6. 如权利要求1、2、3 或 4 所述的一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于所说的第4、第5步骤之间，包括用水洗涤所说颗粒，并分离提取进一步纯化的固相聚羟基脂肪酸脂颗粒。

7. 如权利要求5所述的一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内内聚羟基脂肪酸酯的方法，其特征在于所说的第4、第5步骤之间，包括用水洗涤所说颗粒，并分离提取进一步纯化的固相聚羟基脂肪酸脂颗粒。

从细菌菌体中分离提纯细菌胞内聚羟基脂肪酸酯的方法

本发明属于生物工程下游后处理技术领域。

聚羟基脂肪酸酯 (Poly- β -Hydroxyalkanoates, 简称 PHA) 是一种细菌胞内内含物, 具有热塑性塑料的特性。同时因为它所具有的生物可降解性和生物可相容性, 使其在各方面有应用潜力。但由于它以内含物的形式存在于细菌体内, 成分复杂, 使其提纯极其困难。已有的下游后处理提纯工艺, 或者利用有机溶剂 (如氯仿、二氯甲烷等) 进行抽提, 或者采取高温加热结合使用多种价格昂贵的酶类分解细胞中的非聚羟基脂肪酸酯成分以达到提纯的目的。生产工艺复杂, 设备投资高, 原料成本昂贵, 导致聚羟基脂肪酸酯产品价格过高, 使这种大有前途的生物可降解塑料难以推广使用。本发明申请人通过实验发现, 先用阴离子碱性溶液处理细菌菌体, 分离提取聚羟基脂肪酸酯颗粒, 再用蛋白酶进一步处理除去颗粒上残留的蛋白杂质, 可获得高纯度的聚羟基脂肪酸酯产品。由于本工艺反应条件温和, 对设备无特殊要求, 原料廉价, 适合工业化大规模生产的要求, 大大降低了聚羟基脂肪酸酯的生产成本。

本发明的目的在于提出使用便宜的阴离子表面活性剂与少量的蛋白酶, 利用一般发酵工厂的现有设备, 从细菌的发酵产物中提取纯化聚羟基脂肪酸酯产品, 使产品成本大为降低。

本发明提出一种从细菌菌体中分离提纯细菌胞内聚羟基脂肪酸酯的方法, 其特征在于包括以下步骤: 1) 先用阴离子表面活性剂碱性溶液搅拌洗涤细菌菌体; 结果使细菌破壁并将其胞壁降解为小碎片, 同时释放出细胞内容物。2) 分离提取固相的聚羟基脂肪酸酯颗粒; 除去发酵中产生的大部分非聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 成分; 3) 再用碱性蛋白质的酶溶液进一步搅拌洗涤所说颗粒, 除去残留的蛋白杂质, 进一步提高其纯度并大大降低它的蛋白杂质含量, 使其满足进一步加工的要求; 4) 分离提取纯化固相聚羟基脂肪酸酯颗粒; 5) 干燥得到高纯度粉末状聚羟基脂肪酸酯产品。本发明所说的碱性溶液的 pH 值在 9—13 范围内。洗涤温度可在 20—100℃ 范围内。所说的分离提取方法可为离心或过滤分离收集洗涤液中的沉淀物。本发明还进一步在所说的第二、第三步骤之间包括用水洗涤所说颗粒, 进一步除去非聚羟基脂肪酸酯成分与所加表面活性剂, 并分离提取固相聚羟基脂肪酸酯颗粒。所说的第 4、第 5 步骤之间, 还可包括用水洗涤所说颗粒, 并分离提取进一步纯化的固相聚羟基脂肪酸酯颗粒。

本发明工艺的适用处理对象广泛, 可处理多种含聚羟基脂肪酸酯的细菌及其变异株及基因工程重组菌株的发酵产物, 对菌体的聚羟基脂肪

酸酯含量要求不高。

本发明可根据处理对象不同，在阴离子表面活性剂处理过程中选择相应的阴离子表面活性剂种类，适宜的处理条件（例如溶液的处理的浓度，表面活性剂的用量比，处理的 pH 值条件以及处理的温度）。阴离子表面活性剂溶液的碱性条件可通过加入各种碱类及碱性盐类来获得。本发明还可根据所使用蛋白酶的特性选择适宜的反应条件（如作用浓度，pH 值，温度和时间），以提高产生纯度，降低生产成本。

本发明与已有的提纯工艺相比，具有以下特点：（1）不使用有机溶剂，设备投资少，环境污染小；（2）使用的阴离子表面活性剂价格便宜；（3）使用的蛋白酶相对较便宜，且用量很少，原料成本低；（4）产品纯度高；（5）可采用普通发酵工厂的现有设备进行生产。

通过本发明工艺生产的聚羟基脂肪酸酯产品具有纯度高，蛋白含量小，产品分子量高的特点。适合进一步加工使用。

实施例一：从维氏固氮菌（*Azotobacter vinelandii*）的菌体中提取聚羟基脂肪酸酯。

菌种：维氏固氮菌 UWD（*Azotobacter vinelandii* UWD）

细胞干重中聚羟基脂肪酸酯（PHA）含量：50%；

阴离子表面活性剂：十二烷基磺酸钠；

阴离子表面活性剂洗涤液浓度：0.4-0.7%(w/v)；

阴离子表面活性剂洗涤液 pH 值：11；

阴离子表面活性剂洗涤温度：40°C；

阴离子表面活性剂洗涤时间：30 分钟；

阴离子表面活性剂用量与细胞干重中非聚羟基脂肪酸酯成分之比：1/10 (w/w)；

蛋白酶：2709 碱性蛋白酶液（酶活约 50,000Unit/ml）；

蛋白酶处理 pH 值：11；

蛋白酶处理温度：40°C；

蛋白酶处理时间：30 分钟；

蛋白酶用量与原始细胞干重中非聚羟基脂肪酸酯成分之比：5,000Unit/g；

反应系统碱性调节剂：NaOH。

本实施例的生产工艺流程如下：

通过发酵并离心得到含聚羟基脂肪酸酯（PHA）约 50%的维氏固氮菌 UWD 菌体。取约 1000g（等值干重）菌体，加入十二烷基磺酸钠 50g，自来水 10L，用 NaOH 溶液调节反应体系 pH 值使之保持在 11 左右。保持温度 40°C 以上搅拌洗涤 30 分钟。再加入 5L 自来水和 50ml 碱性蛋白酶液，调节反应体系 pH 值使之保持在 11 左右。保持温度 40°C 左右搅拌 30 分钟，离心收集沉淀，加入自来水搅拌

洗涤，再次离心收集沉淀。烘干沉淀，即得粉末状高纯度聚羟基脂肪酸酯（PHA）产品。

制得的聚羟基脂肪酸酯（PHA）产品纯度大于 96%，蛋白含量小于 0.5%。具有良好的可加工性。

实施例二：从具有 PHA 合成能力的基因工程重组大肠杆菌（*E. coli*）的菌体中提取聚羟基

脂肪酸酯。

菌种：基因工程重组大肠杆菌（*E. coli*）

细胞干重中聚羟基脂肪酸酯（PHA）含量：70%；

阴离子表面活性剂：十二烷基磺酸钠；

阴离子表面活性剂洗涤浓度：0.65-0.90%(w/v)；

阴离子表面活性剂洗涤 pH 值：11；

阴离子表面活性剂洗涤温度：60℃；

阴离子表面活性剂洗涤时间：30 分钟；

阴离子表面活性剂用量与细胞干重中非聚羟基脂肪酸酯成分之比：1/8 (w/w)；

蛋白酶：2709 碱性蛋白酶液（酶活约 50,000Unit/ml，最适反应条件为温度 40℃，pH 值 11）；

蛋白酶处理 pH 值：11；

蛋白酶处理温度：40℃；

蛋白酶处理时间：1 小时；

蛋白酶用量与原始细胞干重中非聚羟基脂肪酸酯成分之比：3,000Unit/g；

反应系统碱性调节剂：Na₂CO₃。

本实施例的生产工艺流程如下：

通过发酵生产菌种（基因工程重组大肠杆菌）得到聚羟基脂肪酸酯（PHA）含量约占细胞干重 70%的菌体，离心收集菌体。取约 500g（等值干重）菌体，加入十二烷基磺酸钠 18.75g，自来水 2.5L，向溶液中加入 Na₂CO₃ 调节反应体系 pH 值使之保持在 11 左右。保持温度 60℃ 以上搅拌洗涤 30 分钟。离心收集沉淀，加入自来水搅拌洗涤 5 分钟，再次离心收集沉淀。向沉淀中加入碱性蛋白酶液 9ml，自来水 1L，加入 Na₂CO₃ 调节反应体系 pH 值使之保持在 11 左右。保持温度 40℃ 左右搅拌洗涤 1 小时，离心收集沉淀，加入自来水搅拌洗涤 5 分钟，再次离心收集沉淀。烘干沉淀，即得粉末状高纯度聚羟基脂肪酸酯（PHA）产品。

制得的聚羟基脂肪酸酯（PHA）产品纯度大于 97%，蛋白含量小于 0.2%。具有良好的可加工性。

实施例三：从巨大产碱杆菌（*Alcaligenes latus*）的菌体中提取聚羟基

基脂肪酸酯。

菌种：巨大产碱杆菌 DSM (*Alcaligenes latus* DSM)

细胞干重中聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 含量：60%；

阴离子表面活性剂：十二烷基苯磺酸钠；

阴离子表面活性剂洗涤浓度：0.5%(w/v)；

阴离子表面活性剂洗涤 pH 值：12；

阴离子表面活性剂洗涤温度：80°C；

阴离子表面活性剂洗涤时间：1 小时；

阴离子表面活性剂用量与细胞干重中非聚羟基脂肪酸酯成分之比：1/5 (w/w)；

蛋白酶：高温碱性蛋白酶液（酶活约 100,000Unit/ml，最适反应条件为温度 60°C，pH 值 10）；

蛋白酶处理 pH 值：10；

蛋白酶处理温度：60°C；

蛋白酶处理时间：1 小时；

蛋白酶用量与原始细胞干重中非聚羟基脂肪酸酯成分之比：4,000Unit/g；

反应系统碱性调节剂：NaOH。

本实施例的生产工艺流程如下：

通过发酵巨大产碱杆菌 DSM 得到聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 含量约占细胞干重 60% 的菌体，离心收集菌体。取约 500g (等值干重) 菌体，加入十二烷基苯磺酸钠 40g，自来水 8L，用 NaOH 溶液调节反应体系 pH 值使之保持在 12 左右。保持温度 80°C 以上搅拌洗涤 1 小时。离心收集沉淀，加入自来水搅拌洗涤 10 分钟，再次离心收集沉淀。向沉淀中加入高温碱性蛋白酶液 8ml，自来水 4L，用 NaOH 溶液调节反应体系 pH 值使之保持在 10 左右。保持温度 60°C 左右搅拌洗涤 1 小时，离心收集沉淀，加入自来水搅拌洗涤 10 分钟，再次离心收集沉淀。烘干沉淀，即得粉末状高纯度聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 产品。

制得的聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 产品纯度大于 94%，蛋白含量小于 0.6%。具有良好的可加工性。